

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation 4 :</b> C08F 292/00, B01J 20/30 C12Q 1/00, C12N 1/02 G01N 30/00, 33/68, 33/92 G01N 33/50	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 89/ 02449</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 23. März 1989 (23.03.89)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP87/00536  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 18. September 1987 (18.09.87)  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> THIES, Karsten [DE/DE]; Deutzer Strasse 64, D-4040 Neuss-Grimmlingshausen (DE). HEUCK, Claus-Christian [DE/DE]; Im Lin- dengrund 4, D-6917 Schönau-Altneudorf (DE).  <b>(74) Gemeinsamer Vertreter:</b> HEUCK, Claus-Christian; Im Lindengrund 4, D-6917 Schönau-Altneudorf (DE).  <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), BE (eu- ropäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (eu- ropäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (eu- ropäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.		<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
<b>(54) Title:</b> REAGENT AND PROCESS FOR BINDING POLYMERS TO MICRO-ORGANISMS IN AQUEOUS SO- LUTIONS  <b>(54) Bezeichnung:</b> REAGENZ UND VERFAHREN ZUR BINDUNG VON POLYMEREN UND MIKROORGANIS- MEN IN WÄSSRIGEN LÖSUNGEN  <b>(57) Abstract</b>  A process is disclosed for producing adsorption matrices having specific binding properties, high chemical and me- chanical stability and high binding capacity towards polymers or micro-organisms to be adsorbed from an aqueous solu- tion. These matrices are useful for qualitative and quantitative analysis, for the preparation or selective removal of (in some cases pathogenic) biopolymers in vitro and/or in vivo, or for binding or removing micro-organisms for microbiological or biotechnological purposes.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Adsorptionsmatrices mit spezifischen Bindungseigenschaf- ten bei hoher chemischer und mechanischer Stabilität und hoher Bindungskapazität gegenüber aus einer wässrigen Lösung zu adsorbierenden Polymeren oder Mikroorganismen. Die erfindungsgemäß hergestellten Matrices sind für die qualitative und quantitative Analyse sowie für die Präparation oder die selektive Elimination von - gegebenenfalls pathogenen - Biopo- lymeren in vitro und/oder ex vivo oder zur Bindung oder Elimination von Mikroorganismen für mikrobiologische der bio- technologische Zwecke geeignet.		

Ref. #55  
SMX 3093.6 (2001-006R1)  
S.N. 10/043,394  
Filed January 10, 2002  
Confirmation No. 4664

### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabun	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	HU	Ungarn	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	IT	Italien	RO	Rumänien
BJ	Benin	JP	Japan	SD	Sudan
BR	Brasilien	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	TG	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
FI	Finnland	ML	Mali		

## Reagenz und Verfahren zur Bindung von Polymeren und Mikroorganismen in wässrigen Lösungen

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Matrix zum Zwecke der Isolation, Präparation oder Elimination eines Analyts oder eines Mikroorganismus aus einer wässrigen Lösung.
- Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren und Reagenz zur Isolation von Biopolymeren oder Mikroorganismen aus wässrigen
- 6 Flüssigkeiten für analytische, präparative oder kurative Zwecke gegebenenfalls in extrakorporalen Perfusionssystemen .

### Stand der Forschung

- 5 Isolationsverfahren zur Gewinnung ,Reinigung ,Analyse und Beseitigung von Biopolymeren oder Mikroorganismen werden heute für biotechnologische Belange, in der biochemischen und medizinischen Forschung sowie zum Zwecke der Behandlung von Arzneimitteltherapieresistenten
- 6 Krankheiten eingesetzt. So gelingt es z.B. mit Hilfe von extrakorporalen Immunperfusionsverfahren pathogene Biopolymere aus menschlichem Plasma zu entfernen. Gegenüber der Plasmapheresetechnik bietet dieses therapeutische Prinzip den Vorteil der selektiven Elimination

eines Pathogens ohne den gleichzeitigen Verlust anderer für einen lebenden Körper essentieller Biopolymere.

Um Isolationsverfahren ex vivo zu medizinisch-therapeutischen Zwecken nutzen zu können, müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Die Elimination eines Pathogens sollte möglichst selektiv erfolgen.
2. Die Bindungskapazität der einen Stoff eliminierenden Matrix sollte optimalen praktischen Anforderungen genügen.
3. Die bindende Matrix darf keine toxischen Wirkungen zeitigen.
4. Das Eliminationsverfahren darf keine physiologischen Schutzmechanismen aktivieren, deren in Folge der Behandlung eingeleitete Reaktion gegebenenfalls unerwünschte Wirkungen auslösen.

Diese Voraussetzungen stellen hohe Anforderungen an die Qualität des Materials, das mit einer z.B. dem Körper wieder zurückzuführenden Körperflüssigkeit zum Zwecke der Elimination eines Pathogens durchmischt oder durchströmt wird.

5. Eine spezifische Elimination kann durch eine immunologische Reaktion, d.h. durch eine hochaffine Bindung des zu eliminierenden Biopolymers als Antigen an einen für das Antigen spezifischen Antikörper, gegebenenfalls unter Beteiligung eines Haptens, erfolgen. Einige in biologischen Flüssigkeiten vorhandenen Biopolymere binden andererseits spezifisch an Polymere, die nicht dem immunologischen System zugeordnet sind. Diese Polymere können biologischer oder synthetischer Natur sein.

Beispielsweise binden bestimmte Proteine spezifisch an Lectine (US-PS 955 279 ) oder an Polyanionen. In Gegenwart von mehrwertigen Kationen binden Biopolymere ,z.B. Lipoproteine oder gamma-Globuline, bei pH-Werten oberhalb ihres isoelektrischen Punktes an sulfatierte Polysaccharide oder Polyphosphate. Am isoelektrischen Punkt der Lipoproteine gelingt auch eine Ausfällung aus Plasma oder Serum durch diese Polyanionen ohne Zusatz von mehrwertigen Kationen (US-PS 4 125 993). Sulfatierte Polysaccharide wurden daher auch als spezifische Reagentien zur Isolation von bestimmten Biopolymeren aus Körperflüssigkeiten verwendet.

Die Techniken zur Trennung und selektiven Elimination einzelner Komponenten wässriger Biopolymermischungen sind vielfältig (z.B. Präzipitation, Agglutination, Adsorption etc.). Für extrakorporale Eliminationssysteme durch Adsorption an eine Festphase sind verschiedene Materialien (z.B. Agarose, organische Polymerisate oder Kopolymerisate, mit Polymer beschichtete Kieselgele geprüft worden (GB-PS 7936573; Stoffel, W. & Demant, Th., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 611-615, 1981; US-PS 4 103 865 ). Für Trenn- und Extraktionszwecke in vitro sind Festphasen auf der Basis von Silica zwar geeignet, da die mechanischen Eigenschaften von Silica im Gegensatz zu denen organischer Festphasen bei Perfusionsverfahren zum Zwecke einer Adsorption eine hohe Durchflußrate der aufzutrennen-

den Polymerlösungen gewährleisten (D-PS 3 225 603.5-35); wegen der bekannten Aktivierung des Gerinnungssystems, des Complementsystems, sowie von Blutplättchen durch Silanolgruppen ist diese Matrix jedoch für eine Anwendung in einem extrakorporalen Perfusionssystem nicht verwendbar.

- 5 Es hat nicht an Versuchen gefehlt, durch kovalente Bindung eines antithrombogenen Agens, insbesondere Heparin, an Silica die Thrombogenität der Festphase zu beseitigen. Die bisherigen Erfolge waren jedoch insbesondere für die Belange der Adsorption eines Analyten an eine Matrix in einem extrakorporalen Perfusionssystem zu medizinisch-therapeutischen Zwecken unzureichend. Zwar sind verschiedene Verfahren der kovalenten Bindung von Heparin an organische Festphasen beschrieben worden, bei denen spezifische Bindungseigenschaften des Mucopolysaccharids erhalten bleiben (Miura, Y. et al. Biomed. Materials Res. 14, 619-630, 1980; Ellsworth, J. L. et al. J. Lipid. Res. 23, 653-659, 1982; Ebert, C. D. & Kim, S. V., Thromb. Res. 26, 43-57, 1982); diese Verfahren erwiesen sich jedoch für eine kovalente Bindung von Heparin an Silica zur Herstellung einer Adsorber-Matrix für ex vivo Perfusionszwecke nicht anwendbar. Entweder gelang es nicht, die Thrombogenität der Silicaphase zu beseitigen, oder die Beladung der Silica-Festphase z.B. durch Kopplung von Heparin mittels Bromcyan, Cyanurchlorid, Woodward's Reagenz K, Carbodiimid oder von aldehydderivatisiertem Heparin und damit auch die spezifische Bindungskapazität dieser

Heparin-Silicaphasen gegenüber Biopolymeren, die hochaffin an Heparin binden, war zu gering. Bei einigen Kopplungsverfahren wurden spezifische Bindungseigenschaften von Heparin aufgehoben.

5 So wurde beispielsweise ein Immunadsorbens mit Controlled Pore Glas für Immunperfusionszwecke, in dem Heparin mit Antigenen oder Antikörpern mittels Carbodiimid an ein aminopropylsilanisierendes Silica zum Zwecke der Biokompatibilität jedoch nicht zum Zwecke der Adsorption von Biopolymeren kovalent gebunden ist, entwickelt (D-PS 25 32 883.0-35).  
Typischer Weise bindet diese Heparin-Silica Phase zwar Antithrombin III  
0 die spezifische Bindungsfähigkeit gegenüber Thrombin oder Lipoproteinen aus Plasma oder Serum ist jedoch aufgehoben.

#### 5 Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung war die Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung einer Adsorbermatrix, die die Voraussetzungen zur Verwendung in einem extrakorporalen Perfusionssystem erfüllt und die die vorteilhaften Eigenschaften von Silica mit den spezifischen Bindungseigenschaften von Heparin verbindet, ohne daß sich die nachteiligen  
0 Eigenschaften von Silica in der Verwendung ex vivo auswirken. Dieses Ansinnen beinhaltet verständlicher Weise auch die Nutzung dieser Matrix

für Adsorptionsprozesse in vitro für analytische oder präparative Belange. Ziel der Erfindung war ferner die Herstellung einer Adsorbiermatrix zur Verwendung für die genannten Belange mit den vorteilhaften, jedoch ohne die für praktische Belange nachteiligen Eigenschaften von Heparin.

Erfindungsgemäß wurde festgestellt, daß ein nichtthrombogenes, stabiles Adsorbens aus Heparin und Silica hergestellt werden kann, in dem bei einer hohen Bindungskapazität der Festphase die spezifischen Bindungseigenschaften von Heparin gegenüber Biopolymeren, insbesondere gegenüber jenen des Gerinnungssystems und des Komplementsystems, sowie Lipoproteinen aus Blut, Plasma oder Serum mit einer spezifischen Dichte  $< 1,063 \text{ Kg/L}$  erhalten sind. Die erfindungsgemäße Synthese der Matrix ist dadurch gekennzeichnet, daß saures Mucopolysaccharid, z.B. Heparin, an ein amino- und/oder Carboxylgruppen haltiges mono-, oligo-, oder polymeres Molekül, das wiederum an Silica kovalent gebunden ist, in einer Weise gekoppelt wird, daß die spezifischen Eigenschaften z.B. gegenüber Thrombin, Antithrombin III oder - in Gegenwart erhöhter Konzentrationen freier mehrwertiger Metallkationen - Lipoproteinen mit einer spezifischen Dichte  $< 1,063 \text{ Kg/L}$  erhalten bleiben. Bemerkenswert ist ferner, daß die Form, Partikelgröße und Porosität der erfindungsgemäß mit Heparin beschichteten Silicafestphase zwar die spezifische Bindungskapazität bestimmt, jedoch sich nicht auf die Aktivierung des

Gerinnungssystems, des Complementsystems oder der Thrombozyten im Blut auswirkt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Herstellung und Verwendung einer Adsorptionsmatrix, die selektiv Low Density Lipoproteine aus Blut, Plasma oder Serum ohne Zusatz von mehrwertigen Kationen bindet. 5 Nach den bisherigen Vorstellungen erfolgt die Bindung von Lipoproteinen an Polyanionen über stark saure Residuen, d.h. über Sulfatgruppen oder über Phosphatgruppen. Die Bindung kommt in Gegenwart von Haptenen, z.B. mehrwertigen Metallkationen, deren Konzen- 0 trationen deutlich über den natürlicherweise in Körperflüssigkeiten vorhandenen Konzentrationen an freien, d.h. ungebundenen, Kationen liegen, zustande. Überraschender Weise wurde festgestellt, daß Lipoproteine, insbesondere die Arteriosklerose fördernde Serumlipoproteine, (d.h. Low Density Lipoproteine, LDL, mit einer spez. Dichte 1,006-1,063 Kg/L) 5 in Gegenwart mehrwertiger Metallkationen, deren freie Konzentrationen geringer oder gleich den freien Kationenkonzentrationen in Körperflüssigkeiten sind, bei einem pH oberhalb ihres isoelektrischen Punktes an schwachsaure Polyanionen, z.B. Polycarboxylate gebunden werden. Diese überraschende Beobachtung führte erfindungsgemäß 0 zu der Synthese einer Matrix, die sich für die Elimination von Serumlipoproteinen in vitro oder ex vivo aus Plasma oder Blut hervorragend geeignet.

Gegenüber dem Eliminationsverfahren mit Hilfe einer Heparin-Silica Matrix zeichnet sich die Polykarbonsäure-Matrix, insbesondere die Polyakrylat-, Polymethakrylat- oder Polymaleinat-Matrix oder Matrices mit Kopolymerisaten der genannten Säuren dadurch aus, daß die Adsorption von Serumlipoproteinen aus Blut, Plasma oder Serum bei einem pH 5,0 bis 9,5 ohne Erhöhung der Konzentrationen der mehrwertigen Metallkationen in der Körperflüssigkeit erfolgt.

Gegenüber einem Immunperfusionsverfahren mit an eine Festphase gekoppelten Antikörpern zeichnet sich das erfindungsgemäße Verfahren mit einem Heparin-Silica Adsorbens bzw. mit einem Polycarbonsäure-Adsorbens durch eine preiswerte Herstellung, durch die hohe Stabilität und Lagerfähigkeit, durch die Möglichkeit der Sterilisation sowie durch eine fehlende Antigenität aus.

5

#### Beispiel 1

##### Kopplung von Heparin an Silica

15 g Kieselgel werden in 100 ml einer gamma-Glycidoxypropyltrialkyl-oxysilanlösung erwärmt. Alternativ können auch andere Epoxydgruppenhaltige Silylverbindungen verwendet werden. Anschließend wird das silanisierte Silica gewaschen und getrocknet. Das getrocknete Epoxypropylsilanisierte Silica wird mit einer wässrigen oder alkoholi-

schen Lösung einer alpha-, beta-, oder gamma-Aminokarbonsäure, z.B. Lysin oder Cystein, -alternativ können auch Oligopeptide oder Polymere von Vinylamin oder Äthylenimin oder deren Kopolymerisate mit Akrylsäure Maleinsäure, Methakrylsäure oder deren Nitrile oder Amide verwendet werden-

5 Über mehrere Stunden erwärmt, gewaschen und getrocknet.

Das Aminokarbonsäure-oxypropylsilanierte Silica wird mit einem Karbaminsäureester, z.B. N-Ethoxycarbonyl-2-Ethoxy-1,2-Dihydro-Chinolin, (Fa. SERVA, Heidelberg), aktivierten Heparin (500 mg )

umgesetzt und anschließend gewaschen. Die kovalent gebundene

0 Menge von Heparin beträgt in Abhängigkeit der für die Umsetzung angebotenen Silica Oberfläche 2 bis 100 mg /ccm Festphase.

Alternativ kann Silica auch mit eine Mercaptogruppe enthaltenden Silan, z.B. Mercaptopropyltrialkyloxysilan, silaniert werden. 10 g des mercaptopropylsilanierten Silica werden mit einer 10%igen

5 Lösung von Oxypropyldiglycidäther in Tetrahydrofuran (100 ml) bei Zimmertemperatur verrührt. Nach 12 Std. wird die Festphase gründlich mit Tetrahydrofuran und anschließend mit Äther gewaschen. Die weitere Synthese erfolgt wie zuvor beschrieben.

## Beispiel 2

Selektive Extraktion von Low Density Lipoproteinen aus Humanplasma  
mit einer Heparin-Silica Matrix

Eine Säule mit einem Volumen von 10 ccm wird mit einem nach Beispiel 1  
hergestellten Heparin-Silica (Korngröße 100 Micrometer, Porengröße  
1000 Nanometer) gepackt. 50 ml eines heparinisierten Humanplasma  
wird mit Ca<sup>++</sup> Ionen zur Herstellung einer 20-50 millimolaren Lösung  
versetzt. Das Plasma wird durch die Säule mit einer Flußrate von 2ml/min  
passiert. Die Veränderungen der Konzentrationen einzelner Plasmakompo-  
nenten sind in der Tabelle aufgeführt:

	Chol	Tg	HDL	ApoB	ApoA	AT III	Fib	Plasm	IgG	a-2-m
vor	168	98	35	93	204	11,5	286	29	1132	128
nach	63	30	32	0	204	1,6	286	29	1146	121

vor: Plasma vor Perfusion  
nach: Plasma nach Perfusion  
Chol: Serum-Cholesterin (mg/dl)  
Tg: Serum-Triglycerid (mg/dl)  
HDL: HDL-Cholesterin (mg/dl)  
ApoB: Serum-Apolipoprotein B (mg/dl)  
ApoA: Serum-Apolipoprotein A (mg/dl)

AT III : Antithrombin III (U/ml)  
Fib : Fibrinogen (mg/dl)  
Plasm: Plasminogen (mg/dl)  
IgG: Immunglobulin G (mg/dl)  
a-2-m: alpha-2-Makroglobulin  
(mg/dl)

Der Vergleich der Konzentrationen vor und nach Perfusion zeigt deutlich  
den Effekt der Elimination der Apolipoprotein B haltigen Lipoproteine,

die bekanntlich eine spezifische Dichte  $<1,063 \text{ Kg/L}$  haben, und des Antithrombin III, während die Konzentrationen der anderen Parameter unverändert sind.

5

### Beispiel 3

Biokompatibilitätsprüfung der Heparin-Silica Matrix

2,5 Liter Plasma eines Schafes, mit  $\text{Ca}^{++}$  Ionen versetzt (Endkonzentration  $50 \text{ millimolar}$ ) und mit Heparin stabilisiert, werden in einem extrakorporalen System durch eine Säule von  $200 \text{ ccm}$  Inhalt, die mit einer nach Beispiel 1 hergestellten Adsorbermatrix gepackt ist, ex vivo mit einer Flußrate von  $20$  bis  $25 \text{ ml/min}$  perfundiert, anschließend zur Reduktion des Calcium auf physiologische Konzentrationen dialysiert. Nach Wiedervereinigung mit den zuvor durch Zentrifugation abgetrennten Blutzellen wird das rekonstituierte Blut dem Schaf wieder reinfundiert. Das Tier toleriert die Behandlung ohne Zeichen unerwünschter Nebenwirkungen. Die Veränderungen einzelner Plasma-Bestandteile sind in der Tabelle aufgeführt. (Die Abkürzungen entsprechen denen für in Beispiel 2 aufgeführte Parameter)

10

	Chol(mg/dl)	Tg(mg/dl)	AT III(U/ml)
Plasma vor Perfusion	64	41	20,9
Plasma nach Perfusion.	35	16	21,2

## Beispiel 4

Adsorption von Biopolymeren an die Heparin-Silica Matrix unter Erhaltung spezifischer Merkmale

- Auf eine mit einer nach Beispiel 1 hergestellten Matrix gefüllten
- 5 Säule mit einem Volumen von 5 ccm wird 1 ml eines mit 5000 enzymatischen Einheiten Thrombin angereichertes Humanserum aufgegeben.
- Danach wird die Säule mit 20 ml einer 0,15 molaren NaCl-Lösung gespült. Zur Prüfung der Enzymaktivität wird dem Kochsalz-Eluat eine Fibrinogenlösung (Endkonzentration 250 mg/dl) zugesetzt.
- 0 Es bildet sich kein Fibringerinnsel. Das Gerinnsel ist jedoch sofort in einem Eluat einer Fibrinogenlösung, die durch die mit 0,15 molarer NaCl Lösung gespülten Säule perfundiert wird, nachweisbar.

5

## Beispiel 5

Herstellung einer Polyacrylat-Silica Adsorbermatrix

- Ein nach Beispiel 1 hergestelltes Amino- und/oder Carboxylgruppenhaltiges Silica (15 g) wird mit einer Lösung gemäß Beispiel 1 aktivierter
- 0 Polyakrylsäure (0,5 g, Molekulargew. 250000) umgesetzt und gewaschen.
- Alternativ können auch andere Karbonsäuren, z.B. Polymethakrylsäure, Polymaleinsäure oder Kopolymerisate der genannten monomeren Säuren mit

Äthylen oder Vinyl-, Allyl-, oder Akrylderivaten (z.B. Akrylnitril, Akrylamid) verwendet werden. In den Kopolymerisaten sollte der Anteil der monomeren Säure nicht unter 30 Mol Prozent betragen. Alternativ können ferner reaktionsfähige Derivate der genannten Polymere bzw. Kopolymere (Säure-

5 halogenide, Säureanhydride oder Mischanhydride mit niedermolekularen Säuren z.B. Ameisensäure, Essigsäure oder Propionsäure) sowie Polyzuckersäuren biologischer, synthetischer oder halbsynthetischer Herkunft (z.B. Polygalacturonsäure, Polyglucuronsäure oder deren reaktionsfähige und in die freie Polysäure überführbare Derivate) umgesetzt werden. Das

10 Molekulargewicht der Polysäuren ist für die kovalente Bindung unwesentlich. Zur Herstellung einer z.B. Lipoprotein adsorbierenden Matrix sollte die Moleküllänge der Polysäure nicht kürzer als 100 nm sein. Für andere Belange, z.B. für die Adsorption von Thrombin, eignen sich auch Polysäuren von kürzerer Länge. Die Prüfung einer

15 kovalenten Bindung der Polykarbonsäure an die Festphase erfolgt nach eingehender Spülung der Matrix mit einer hochkonzentrierten Salzlösung und ggfs. nach einer Hydrolyse von chemisch noch reaktions-

20 fähigen Gruppen je nach Art der gekoppelten Polykarbonsäure mit bekannten chemischen, physiko-chemischen und/oder biochemischen Nachweismethoden. Die kovalent gebundene Menge der Karbonsäure beträgt je nach Größe des Polymers und je nach Größe der für die Umsetzung zur Verfügung stehenden Silicaoberfläche 0,5 bis 500 mg/ccm Festphase.

## Beispiel 6

## Herstellung einer Heparin-Polykarbonsäure Silica Matrix

15,5g einer nach Beispiel 6 hergestellten Matrix werden mit einer

20%igen Lösung von Essigsäureanhydrid in Tetrahydrofuran 100 ml

- 5 4 Std. auf 50°C erwärmt. Anschließend wird die Festphase mit Tetrahydrofuran und Äther gründlich gewaschen und in eine 10%ige Lysinlösung eingetragen. Die weitere Synthese erfolgt gemäß Beispiel 1.

Der Nachweis der Bindung von Heparin erfolgt gemäß Beispiel 4.

## Beispiel 7

## Adsorption von Low Density Lipoproteinen an Polykarbonsäure-Silica

Die Versuchsdurchführung erfolgt wie in Beispiel 2 beschrieben unter

- 5 Verwendung einer nach Beispiel 5 hergestellten Matrix jedoch ohne Zusatz von Calcium zu der Lösung. Die Veränderungen der Konzentrationen einzelner Plasmakomponenten sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. (Die Kennzeichnung der Komponenten entspricht den Angaben in der Tabelle des Beispiel 2.)

	Chol	Tg	HDL-Chol	ApoB	AT III	Fib	Ca
Plasma vor Perfusion	184	117	38	92	10,7	200	1,96
Plasma nach Perfusion	75	94	34	2	9,4	180	1,88

Die Elimination von Low Density Lipoproteinen ist aus der nahezu vollständigen Elimination von Apolipoprotein B, das ausschließlich in Low Density Lipoproteinen (d.h. Lipoproteinen mit einer Dichte 1,006-1,063 Kg/L gebunden ist) und der nur geringfügig verminderten Triglyceridkonzentrationen, die bekanntlich überwiegend in den Very Low Density Lipoproteinen mit einer spez. Dichte  $< 1,006$  Kg/L gebunden sind, ersichtlich.

#### ④ Beispiel 8

Biokompatibilitätsprüfung der Polykarbonsäuresilica Matrix

Die gemäß Beispiel 5 bzw. 6 hergestellte Matrix wird in einem extrakorporalen Perfusionssystem gemäß Beispiel 3 an einem Schaf jedoch nach Zusatz von Citrat, aber ohne Erhöhung der Ca<sup>++</sup> Konzentrationen geprüft. Das Tier erträgt die Reinfusion des ohne zusätzliche Dialyse behandelten Plasma nach Rekombination mit den Blutzellen ohne typische Zeichen einer Kreislaufdysregulation, einer Thrombosierung oder Komplementaktivierung.

## Beispiel 9

Herstellung einer organischen Festphase mit einer kovalent gebundenen Oligo- oder Polykarbonsäure zum Zwecke der selektiven Adsorption von Biopolymeren

- 5 10g einer organischen Festphase, z.B. eines Pfropfpolymerisats aus Polyvinylalkohol und Polypropylen (HOSTAPULP, Hoechst-AG) werden mit 10 g von Oxypropyldiglycidäther in 100 ml Dioxan gelöst unter Zusatz eines Lewis-Katalysators bei Zimmertemperatur umgesetzt. Alternativ können auch andere organische Matrices, z.B. Sepharose, 0 Polyakrylamid etc.), sowie andere Diglycidverbindungen als Kopplungsreagentien umgesetzt werden. Anschließend wird ein Amino- und/oder Carboxylgruppen haltiges Mono-, Oligo-, oder Polymer (10g) gemäß Beispiel 1 an die Festphase gekoppelt. Die kovalente Verknüpfung mit einer Polykarbonsäure, z.B. Polyakrylsäure, bzw. deren 3 reaktionsfähige Derivate oder mit Heparin erfolgt gemäß Beispiel 5 bzw. Beispiel 1. Alternativ kann an eine amino- oder merkaptoderivierte organische Festphase (z.B. Fraktogel, Merck GmbH) die Polykarbonsäure gemäß Beispiel 1 bzw. Beispiel 5 kovalent gebunden werden. Die Adsorptionseigenschaften und Biokompatibilitätseigenschaften der 0 Matrices entsprechen den Beispiel 7 bzw. Beispiel 2 beschriebenen.

## Beispiel 10

## Quantitative Bestimmung von Low Density Lipoprotein Cholesterin

50 ml eines Humanserums werden durch eine mit einer gemäß Beispiel 9 hergestellten Adsorbermatrix gefüllten Säule mit einem Säulenvolumen von 10 ccm perfundiert. Die Säule wird anschließend mit 10 ml einer 1 molaren NaCl Lösung gewaschen. Die Lipidkonzentrationen werden im nativen Serum, im Durchlauf und in dem Eluat zur Berechnung der adsorbierten Lipidmengen bestimmt. Zum Vergleich werden die Cholesterinmengen in den einzelnen Lipoproteinfraktion z.B. nach Friedewald ermittelt.

0

	Nativserum	Durchlauf	Differenz
Serum-Triglycerid (mg)	68,5	46,9	21,6
Serum-Cholesterin (mg)	93,4	27,6	65,8
5 HDL-Cholesterin (mg)	13,8	13,8	0
LDL-Cholesterin (mg)	65,7		

Aus den Daten in der Tabelle wird ersichtlich, daß die adsorbierte Cholesterinmenge der nach Friedewald ermittelten LDL-Cholesterinmenge entspricht.

0

## Beispiel 11

Adsorption von Mikroorganismen an eine Polykarbonsäure Festphase

1 ml einer wässrigen Suspension von einem Escherichia coli hämolyticus Stamm (0,1 Million Keime/ 10 Mikroliter) wurde einer mit einer gemäß

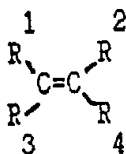
- 5 Beispiel 9 hergestellten Matrix gefüllten Säule mit einem Volumen von 10 ccm aufgetragen. Alternativ wurde ein Versuch mit einer Säule, die eine gemäß Beispiel 6 hergestellte Matrix enthielt, ausgeführt. Im Eluat der Säulen konnten keine Keime nachgewiesen werden.

Die Säulen wurden bei 37 °C über mehrere Tage inkubiert. Die tägliche

- 0 Prüfung von Stoffwechselprodukten bestätigte die Aktivität der Mikroorganismen über einen Zeitraum von mindestens 7 Tagen.

# PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines Reagenz zur Isolation eines Polymers oder Mikroorganismus aus einer wässrigen Lösung in vitro und/oder ex vivo dadurch gekennzeichnet, daß das Reagenz aus einer Festphase, besteht, an die eine Polykarbonsäure oder ein Derivat einer Polykarbonsäure, das in die freie Säureform überführt werden kann, über ein Amino- und/oder Carboxylgruppenhaltiges Mono-, Oligo- oder Polymer kovalent gebunden wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Aminokarbonsäure eine Diaminokarbonsäure, Merkaptoaminokarbonsäure oder Dicarbonsäure, das Oligo- oder Polymer ein Polymerisat oder Kopolymerisat aus Monomeren der allgemeinen Summenformel



wobei  $R^1$  und  $R^2 = -H, -CH_3, -CH_2-CH_3,$

$R^3 = -H, -COOH, -COO-_{1/2},$

$R^4 = -H, -COOH, -COO-_{1/2}, -CH_2OH, -CN, -NH_2, -CONH_2, -O-R$

wobei  $R' = -H, -CH_3, -CH_2-CH_3, -Acetyl$

ist oder aus den Monomeren Galacturonsäure, Glucuronsäure, Äthylenimin Galactosamin, Glucosamin oder Mischungen derselben besteht.

3. Verfahren nach Anspruch 1-2 dadurch gekennzeichnet, daß die Polykarbonsäure biologischer, halbsynthetischer oder synthetischer Herkunft und linear oder verzweigt ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1-3 dadurch gekennzeichnet, daß die Länge der Polykarbonsäure 10 bis 500 000 Nanometer beträgt.
5. Verfahren nach Anspruch 1-4 dadurch gekennzeichnet, daß die Polykarbonsäure ein karboxylgruppenhaltiges Mukopolysaccharid und/oder ein Polymer oder Kopolymer aus Akrylsäure, Methakrylsäure und/oder Maleinsäure mit einem nichtionischen Allyl-, Akryl- oder Vinylmonomerderivat ist, wobei der der Monomerenanteil der Säure mindestens 30 Mol Prozent beträgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1-5 dadurch gekennzeichnet, daß die kovalent zu bindende Polykarbonsäure durch einen Karbaminsäureester aktiviert oder in Form ihres Halogenids, ihres Anhydrids oder Mischanhydrids mit niedermolekularen Säuren oder ihres Methyl-, Äthyl- oder Propylesters umgesetzt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6 dadurch gekennzeichnet, daß der Karbaminsäureester 1-Ethoxy-N-Ethoxycarbonyl-Dihydrochinolin ist.

8. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Festphase Silica oder eine organische Festphase ist.
9. Reagenz zum Zwecke der Isolation eines Polymers oder eines Mikroorganismus aus einer wässrigen Lösung in vitro oder ex vivo dadurch gekennzeichnet, daß es aus einer Festphase besteht, an die über ein Amino- und/oder Karboxylgruppen enthaltendes mono-, oligo- oder polymeres Molekül eine Polykarbonsäure biologischer, halbsynthetischer, oder synthetischer Herkunft kovalent gebunden ist.
10. Reagenz nach Anspruch 9 dadurch gekennzeichnet, daß die Polykarbonsäure ein Mucopolysaccharid und/oder ein Polymerisat oder Kopolymerisat aus Akrylsäure, Methakrylsäure und/oder Maleinsäure und einem nichtionischen Allyl-, Akryl-, oder Vinylmonomerderivat ist, wobei der Monomeranteil der Säure mindestens 30 Mol. Prozent beträgt.
11. Reagenz gemäß Anspruch 9-10 dadurch gekennzeichnet, daß die Festphase Silica oder eine organische Phase ist.
12. Verfahren zur Elimination von Biopolymeren oder Mikroorganismen aus einer wässrigen Lösung dadurch gekennzeichnet, daß die Elimination durch Adsorption an eine Matrix erfolgt, die aus Silica oder eine und/oder organischen Festphase besteht, an die eine Polykarbonsäure über eine Aminokarbonsäure kovalent gebunden ist.

13. Verfahren nach Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet, daß die Elimination eines Biopolymers aus einer Körperflüssigkeit in vitro und/oder ex vivo in einem extrakorporalen Perfusionssystem erfolgt.
14. Verfahren nach Anspruch 11 -13 dadurch gekennzeichnet, daß mit Hilfe eines Reagenz gemäß Anspruch 9 - 11 Serumlipoproteine und/oder Biopolymere, die am plasmatischen Gerinnungssystem mitwirken, aus Körperflüssigkeiten in einem extrakorporalen Perfusionssystem eliminiert werden.
15. Verfahren zur Bestimmung der Konzentration eines Analyts in einer wässrigen Lösung dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des Analyts oder eines seiner Bestandteile direkt oder aus der Differenz der Konzentration des Analyts oder eines seiner Bestandteile vor und nach der Elimination des Analyts aus der Lösung mit Hilfe eines Reagenz gemäß Anspruch 9 - 11 ermittelt wird.
16. Verfahren nach Anspruch 15 dadurch gekennzeichnet, daß der zu bestimmende Analyt Low Density Lipoprotein aus Blut, Plasma oder Serum oder ein Bestandteil desselben ist.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 87/00536

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. Cl. <sup>4</sup> C 08 F 292/00; B 01 J 20/30; C 12 Q 1/00; C 12 N 1/02; G 01 N 30/00; 33/68; 33/92; 33/50		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. <sup>4</sup>	C 08 F	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> *		
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
Y	Chemical Abstracts, Vol. 89, No. 15, 9 October 1978 (Columbus, Ohio, US), E. Boschetti et al.: Immobilization of ligands for affinity chromatography. A comparative study of two condensation agents: 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinothyl)-carbodiimidemetho-p-toluene sulfonate (CMC) and N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ)", see page 256, abstract 125437s, & BIOCHIMIE 1978, 60 (4), 425-7	1-11
Y	Journal of Chromatography, Band 314, 1985, Elsevier Science Publishers B.V., (Amsterdam, NL) P. Maingault et al.: "Immobilization of ligands for affinity chromatography. Coupling on a spacer arm gel with N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline as condensation agent: study of coupling conditions by means of a radioimmunologic method", pages 445-449, see the whole article	1-11
. / .		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
14 June 1988 (14.06.88)	14 July 1988 (14.07.88)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
Y	Chemical Abstracts, Vol. 91, No. 7 13 August 1979 (Columbus, Ohio, US), C.E. Glatz et al.: "The kinetics of binding of serum lipoproteins by immobilized heparin", see page 242, abstract 51510c, & BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 1979 573(2), 382-93 (Eng.)	1-11
A	---	11-16
A	US, A, 4324681 (D.W.HOUSE) 13 April 1982	
A	DE, A, 2735179 (KURARAY CO. LTD) 9 February 1978	
A	WO, A, 84/00375 (BATTELLE DEVELOPMENT CORP.) 2 February 1984	
	-----	

# ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

EP 8700536  
SA 18842

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 24/06/88  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A- 4324681	13-04-82		
DE-A- 2735179	09-02-78	US-A- 4171283	16-10-79
		JP-A- 53022178	01-03-78
		GB-A- 1562969	19-03-80
		JP-A- 53039689	11-04-78
		JP-A- 53103696	09-09-78
WO-A- 8400375	02-02-84	AU-A- 1709283	08-02-84
		EP-A- 0113367	18-07-84
		AU-B- 564534	13-08-87

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen **PCT/EP 87/00536**

<b>I. KLASSEIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben, <sup>5</sup> Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int. Cl. <sup>4</sup> <b>C 08 F 292/00; B 01 J 20/30; C 12 Q 1/00; C 12 N 1/02;          G 01 N 30/00; 33/68; 33/92; 33/50</b>											
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b> <div style="text-align: right; margin-right: 100px;">Recherchiertes Mindestprüfstoff<sup>7</sup></div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%; padding: 5px;">Klassifikationssystem</td> <td style="padding: 5px;">Klassifikationssymbole</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int. Cl.<sup>4</sup></td> <td style="text-align: center; padding: 5px;"><b>C 08 F</b></td> </tr> </table> <p style="text-align: center; margin-top: 5px;">Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen<sup>8</sup></p>			Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	Int. Cl. <sup>4</sup>	<b>C 08 F</b>					
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole										
Int. Cl. <sup>4</sup>	<b>C 08 F</b>										
<b>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup></b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Art*</th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Kennzeichnung der Veröffentlichung<sup>11</sup>, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile<sup>12</sup></th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Betr. Anspruch Nr.<sup>13</sup></th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;"> <b>Chemical Abstracts, Band 89, Nr. 15,            9. Oktober 1978            (Columbus, Ohio, US), E. Boschetti et al.:            Immobilization of ligands for affinity            chromatography. A comparative study of two            condensation agents: 1-cyclohexyl-3-(2-            morpholinothyl)-carbodiimidemetho-p-toluene            sulfonate (CMC) and N-ethoxycarbonyl-2-            ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ)", siehe            Seite 256, Zusammenfassung 125437s,            &amp; BIOCHIMIE 1978, 60(4), 425-7</b> </td> <td style="text-align: center; padding: 5px;">1-11</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;"> <b>Journal of Chromatography, Band 314, 1985,            Elsevier Science Publishers B.V.,            (Amsterdam, NL) P. Maingault et al.:            "Immobilization of ligands for affinity            chromatography. Coupling on a spacer arm gel            with N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydro-            quinoline as condensation agent: study of            coupling conditions by means of a</b> </td> <td style="text-align: center; padding: 5px;">1-11</td> </tr> </table>			Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>	Y	<b>Chemical Abstracts, Band 89, Nr. 15,            9. Oktober 1978            (Columbus, Ohio, US), E. Boschetti et al.:            Immobilization of ligands for affinity            chromatography. A comparative study of two            condensation agents: 1-cyclohexyl-3-(2-            morpholinothyl)-carbodiimidemetho-p-toluene            sulfonate (CMC) and N-ethoxycarbonyl-2-            ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ)", siehe            Seite 256, Zusammenfassung 125437s,            &amp; BIOCHIMIE 1978, 60(4), 425-7</b>	1-11	Y	<b>Journal of Chromatography, Band 314, 1985,            Elsevier Science Publishers B.V.,            (Amsterdam, NL) P. Maingault et al.:            "Immobilization of ligands for affinity            chromatography. Coupling on a spacer arm gel            with N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydro-            quinoline as condensation agent: study of            coupling conditions by means of a</b>	1-11
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>									
Y	<b>Chemical Abstracts, Band 89, Nr. 15,            9. Oktober 1978            (Columbus, Ohio, US), E. Boschetti et al.:            Immobilization of ligands for affinity            chromatography. A comparative study of two            condensation agents: 1-cyclohexyl-3-(2-            morpholinothyl)-carbodiimidemetho-p-toluene            sulfonate (CMC) and N-ethoxycarbonyl-2-            ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ)", siehe            Seite 256, Zusammenfassung 125437s,            &amp; BIOCHIMIE 1978, 60(4), 425-7</b>	1-11									
Y	<b>Journal of Chromatography, Band 314, 1985,            Elsevier Science Publishers B.V.,            (Amsterdam, NL) P. Maingault et al.:            "Immobilization of ligands for affinity            chromatography. Coupling on a spacer arm gel            with N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydro-            quinoline as condensation agent: study of            coupling conditions by means of a</b>	1-11									
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>											
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  <b>14. Juni 1988</b> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           Absendedatum des internationalen Recherchenberichts  <b>14 JUL 1988</b> </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">           Internationale Recherchenbehörde    <b>Europäisches Patentamt</b> </td> <td style="padding: 5px;">           Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten  <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">   <b>P.C.G. VAN DER PUTTEN</b> </div> </td> </tr> </table>			Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <b>14. Juni 1988</b>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <b>14 JUL 1988</b>	Internationale Recherchenbehörde  <b>Europäisches Patentamt</b>	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">   <b>P.C.G. VAN DER PUTTEN</b> </div>					
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <b>14. Juni 1988</b>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <b>14 JUL 1988</b>										
Internationale Recherchenbehörde  <b>Europäisches Patentamt</b>	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">   <b>P.C.G. VAN DER PUTTEN</b> </div>										

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
	radioimmunologic method", Seiten 445-449, siehe den ganzen Artikel --	
Y	Chemical Abstracts, Band 91, Nr. 7, 13. August 1979 (Columbus, Ohio, US), C.E. Glatz et al.: "The kinetics of binding of serum lipoproteins by immobilized heparin", siehe Seite 242, Zusammenfassung 51510c, & BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 1979 573(2), 382-93 (Eng.)	1-11
A	--	11-16
A	US, A, 4324681 (D.W. HOUSE) 13. April 1982	
A	DE, A, 2735179 (KURARAY CO. LTD) 9. Februar 1978	
A	WO, A, 84/00375 (BATTELLE DEVELOPMENT CORP.) 2. Februar 1984  -----	

# ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 8700536  
SA 18842

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.  
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 24/06/88  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A- 4324681	13-04-82	Keine	
DE-A- 2735179	09-02-78	US-A- 4171283	16-10-79
		JP-A- 53022178	01-03-78
		GB-A- 1562969	19-03-80
		JP-A- 53039689	11-04-78
		JP-A- 53103696	09-09-78
WO-A- 8400375	02-02-84	AU-A- 1709283	08-02-84
		EP-A- 0113367	18-07-84
		AU-B- 564534	13-08-87